第 37 卷第 12 期 2017 年 6 月
生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.37,No.12 Jun.,2017

DOI: 10.5846/stxb201605180963
刘卫东,宋伦,吴景.环境样本中微型和微微型浮游植物高通量测序的引物优化.生态学报,2017,37(12):4208-4216.
Liu W D, Song L, Wu J.Optimization of high-throughput sequencing primers for nanophytoplankton and picophytoplankton in environmental samples.Acta Ecologica Sinica,2017,37(12):4208-4216.

环境样本中微型和微微型浮游植物高通量测序的引物优化

刘卫东[1,2,*],宋 伦[1,2],吴 景[1,2]
1 辽宁省海洋水产科学研究院, 大连 116023
2 辽宁省海洋环境监测总站, 大连 116023

摘要:分别以 18SrDNA 的 V4 区和 V9 区为目标基因,采用高通量测序平台和生物信息学方法,分析海水样品中微型和微微型浮游植物多样性。利用在线分析软件对 V4(F/R)、V9(F/R)和 C4(F/R)3 对引物的敏感性、特异性进行了评估和比较,发现自行设计的引物 V4(F/R)对真核藻类的扩增特异性高于 V9(F/R)和 C4(F/R)。高通量测序结果显示,检测样品平均获得 68834 条原始序列,高质量数据占 99%以上,获得基因注释的序列数达 94%以上。3 对引物 V4(F/R)、V9(F/R)、C4(F/R)鉴定的平均微型/微微型浮游植物 OTUs 数分别为 78、42、58,引物 V4(F/R)鉴定效率相对较高,同时对细小微胞藻(*Micromonas pusilla*)、(金牛微球藻 *Ostreococcus tauri*)、密球藻(*Pycnococcus provasolii*)、抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)等优势种检出频率高于引物 V9(F/R)。相对已发表的 2 对引物,设计的引物 V4(F/R)对海洋微型和微微型藻类多样性检测更为高效。

关键词:微型浮游植物; 微微型浮游植物; 高通量测序; 18S rDNA 可变区 V4; 可变区 V9

Optimization of high-throughput sequencing primers for nanophytoplankton and picophytoplankton in environmental samples

LIU Weidong[1,2,*], SONG Lun[1,2], WU Jing[1,2]
1 *Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian* 116023, *China*
2 *Liaoning Ocean Environment Monitoring Station, Dalian* 116023, *China*

Abstract: In this study, nanophytoplankton and picophytoplankton diversity in seawater samples was analyzed using a high-throughput sequencing platform and a series of bioinformatics tools, based on the V4 and V9 region of 18S rDNA as the target gene. High-throughput sequencing, which is considered as one of the most important tools in genomics research, is widely applied in the field of marine nanophytoplankton and picophytoplankton diversity studies. We successfully obtained a pair of nanophytoplankton and picophytoplankton PCR primers V4(F/R) by analyzing the nucleic acid database and using a series of bioinformatics tools. Two pairs of universal primers were also selected for comparative analysis, which amplified variable region V4 and V9 of the small subunit nuclear ribosomal DNA (SSU nrDNA).The sensitivity and specificity of PCR primers V4(F/R), V9(F/R), and C4(F/R) were also evaluated and compared using online bioinformatics software. The results showed that the amplification specificity of primer pair V4(F/R) was better than that of V9(F/R) and C4(F/R) in eukaryotic algae. High-throughput sequencing results showed that 68834 raw tags were amplified by the primers, 99% of

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(2014020182);中国海洋发展研究会重大项目资助(CAMAZDA201605);辽宁省海洋与渔业科研项目(201611);辽宁省科学技术计划项目(2015103044);海洋公益性行业科研专项(201505019)

收稿日期:2016-05-18; **修订日期:**2016-12-22

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: cnliu51@126.com

which were effective tags. Sequences of more than 94% of the effective tags were identified by Ribosomal Database ProjectClassifier, among which 308 operational taxonomic units (OTUs) of one sample were used for further analysis. The average numbers of nanophytoplankton and picophytoplankton OTUs amplified by V4(F/R), V9(F/R), and C4(F/R), were 78, 42, 58,respectively. The primer pair V4(F/R) was found to have higher sensitivity and specificity for amplifying nanophytoplankton and picophytoplankton, including *Micromonas pusilla*, *Ostreococcus tauri*, *Pycnococcus provasolii*, *Aureococcus anophagefferens*,and *Heterosigma akashiwo*. The V4 region from the environmental eukaryotic 18S rDNA gene could be suitable for high-throughput sequencing technology, and it was also a good target gene formarine nanophytoplankton and picophytoplankton identification. This study demonstrates the use of a simple, rapid, high sensitivity, and low-cost technology to explore marine nanophytoplankton and picophytoplankton diversity. Moreover, it also provides a reference for the early warning and control of brown tide disasters.

Key Words: nanophytoplankton; picophytoplankton; high-throughput sequencing; variable region V4 of 18S rDNA; variable region V9

海洋微型和微微型浮游真核藻类具有生长快、密度高、分布广等特点,是海洋初级生产力的重要贡献者,同时也是赤潮、褐潮暴发的致灾种[1]。由于微型和微微型藻类个体微小、缺乏形态学分类指标、多数难以分离培养、无法大量单纯富集,所以传统的分类学方法鉴定较为困难。分子生物学的快速发展,为微型和微微型藻类的多样性研究带来了新突破[2-4]。Handelsman 等[5]于 1998 年正式提出了宏基因组学,主要以环境样品中的微生物群基因组为研究对象;以功能基因筛选、测序分析为研究手段;以微生物多样性、种群结构、系统进化及与环境之间的关系为研究目的。其研究对象已从最初的土壤微生物发展到水体微生物和海样浮游生物[6]。宏基因学主要的研究手段之一是根据核糖体基因 rDNA 数据库进行引物设计,通过系统发生学分析得到该环境中生物的遗传多样性和分子生态学信息[7]。核糖体基因 rDNA 序列进化变异频率缓慢,是生物群落系统进化分类研究主要基因之一,它包括糖体小亚基基因 18S rDNA、5.8S rDNA、大亚基基因 28S rDNA 和转录间隔区 ITS。其中核糖体小亚基基因 18S rDNA 存在于所有真核生物中,是同时具有信息和功能两种作用的核糖体编码基因[8],其数据库丰富、基因序列种类广泛,对引物设计、构建物种亲缘关系等方面都具有不可替代的优势。18S rDNA 由保守区和可变区交替排列组成,具有 9 个可变区[9],可作为种属鉴定的分子标记。

Moon-van der Staay 和 LópezGarcía 通过构建 18S rDNA 克隆文库和分子系统树,分别研究了太平洋近赤道海域表层海水和南极深海中微微型真核浮游生物的多样性[10-11]。在我国邵鹏、袁杰等人分别对厦门西海域和南沙群岛海域微型和微微型浮游藻类建立了 18S rDNA 克隆文库,分析了该水域浮游藻类的多样性[12-14]。自 2005 年起,高通量测序技术发展飞速,由于该技术具有简单快速、测序通量高、错误率低和成本低廉等特点,加速了宏基因组学的发展[15]。Stoeck 和 Behnke 等人对 18s rDNA 的可变区在真核生物多样性研究中的作用进行了分析,为基因标记的选择提供了参考[16-17]。V4 区和 V9 区是目前广泛应用于真核生物多样性研究的目标基因。Amaral-Zettler 通过以 18s rDNA 可变区 V9 为目标基因设计引物,利用高通量测序技术研究了海洋浮游生物多样性[18]。Stoeck 等对以 18s rDNA 的 V4 和 V9 区为目标基因,结合高通量技术获得了挪威峡湾中真核浮游生物的多样性[16]。

由于不同引物对环境中生物多样性的检测效率差异较大,针对微型和微微型浮游植物,本研究分别以 18SrDNA 的 V4 区和 V9 区为目标基因设计和选择引物进行扩增,对引物的敏感性和特异性进行评估和比较分析,采用高通量测序平台和生物信息学方法,应用于辽东湾海域进行微型和微微型浮游植物检测验证,筛选高效检测引物。

1　材料和方法

1.1　引物设计

本文针对目前已知的微型/微微型真核藻类以及黄渤海近岸赤潮生物种类设计了两对引物。首先于

NCBI 数据库调取相关序列,其中包括微微型真核藻类 45 种、中国近岸赤潮生物 71 种及常见真核藻类 73 种,涵盖 8 个门、18 个纲、179 条序列。利用软件 MEGA4 对序列进行多重序列比对,找到对应的 V4 区,同时结合 Hiseq2500 PE250 测序技术要求进行引物设计,片段长度为 300—450bp,为增加测序结果的准确性,充分利用测序技术,以 V4 区为核心区及两侧的保守区设计引物,获得两对引物 V4(F/R),使用 FPCR 软件检测引物对的退火温度 Tm、CG 含量,以及是否会产生二聚体,利用 OligoCalc 软件检测引物自身的互补性,包括潜在的发夹结构、3′端的互补性、自身退火位点的个数等基本参数。

1.2 引物敏感性、特异性评估

采用在线软件 TaxMan,根据核糖体基因数据库,以多来源的 rDNA 为模板,通过多序列全局比对,对引物扩增的生物类群和未扩增的生物类群物种数量进行预测统计及比较,进而对 3 对引物的敏感性、特异性进行评估。本实验选取已发表的海洋真核生物高通量测序引物 V9(F/R)和 C4(F/R)作为比较分析参照物[16]。

1.3 浮游植物鉴定

1.3.1 形态学鉴定

分别在辽东湾长兴岛海域采集 3 份浮游植物水样,经福尔马林固定后带回实验室进行显微镜检测。

1.3.2 分子鉴定

(1)样品采集

现场采集 1L 表层海水,经 20 μm 微孔滤膜过滤去除小型及大型浮游生物,然后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤收集微型和微微型浮游生物,最后将滤膜转移至 1.5 mL 无菌离心管中,置于-20 ℃或-80 ℃冷冻保存、运输。

(2)DNA 提取

采用 CTAB 法提取浮游生物基因组,将 0.22 μm 滤膜剪碎于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL CTAB 裂解液(2% CTAB;100 mmol/L Tris-Cl pH 8.0;1.4 mmol/L NaCl;10 mmol/L EDTA)和 1 μL β-巯基乙醇,5—10 μL 蛋白酶 K,55℃裂解 1—1.5 h。短暂离心,取出液体于新的离心管中,用酚氯仿抽提 2 次后,取上清,加入两倍体积预冷的无水乙醇,沉淀 2—3 h,保留沉淀,使用 75%乙醇清洗沉淀,得到微型浮游生物基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测并利用紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度,-20℃冰箱保存备用。

(3)引物合成和 PCR 扩增

引物序列设计完成,交由上海生工生物公司进行合成。PCR 反应体系为 50 μL,包括 PCR Buffer 5 μL、dNTP Mixture 8μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、模板 DNA 2 μL、Taq DNA 聚合酶 2.5 U,加适量灭菌水。扩增反应均在 PE 9700 型 PCR 仪(PE 公司)上完成,反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 33 个循环;72℃延伸 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将检测合格产物交由诺和致源生物信息科技有限公司,使用 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina(New England Biolabs)建库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测,合格后,使用 Hiseq2500 PE250 进行上机测序。

(4)数据分析

测序得到的原始数据使用 FLASH 软件进行拼接,参照 Qiime 软件质量控制流程,将拼接后的序列经过截取、过滤得到有效数据。利用 Uparse 软件对有效数据进 OTUs(Operational Taxonomic Units)聚类和物种分类分析,RDP Classifier 方法与 Silva 数据库对 OUTs 代表序列进行物种注释分析。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析,同时对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。最后在以上分析的基础上,可以进行一系列的基于 OTUs 和物种组成的聚类分析,挖掘样品内和样品间的物种组成差异。

2 结果

2.1 引物设计

利用软件 MEGA4 对 179 条序列进行多重序列比对,找到对应的 V4 和 V9 区,同时结合测序技术要求进

行引物设计,片段长度为 300—450bp,并使用 FPCR、OligoCalc 等软件对引物的基本参数进行检测和评估,其基本参数满足引物设计的基本要求,引物设计结果见表 1。

表 1　微型藻类 18S rDNA 可变区扩增引物序列

Table 1　Primers used in the 18S rDNA variable region of microalgae

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5′-3′)	引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5′-3′)
V4-F	5′-GCGGTAATTCCAGCTCCAATA-3′	V9-R	5′-CCTTCYGCAGGTTCACCTAC-3′
V4-R	5′-GATCCCCHWACTTTCGTTCTTGA-3′	C4-F	5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3′
V9-F	5′-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3′	C4-R	5′-ACTTTCGTTCTTGATYRA-3′

2.1　引物敏感性、特异性评估

采用在线软件 Taxman 对 3 对引物的敏感性、特异性进行评估,结果如表 2。统计数据显示,引物 V9(F/R)对的整体扩增效率低于引物 V4(F/R)和 C4(F/R),引物 V4(F/R)对真菌、后生动物、领鞭毛虫目类群的扩增特异性低于 C4(F/R),对定鞭藻纲、绿藻门等生物类群的扩增特异性高于 C4(F/R),说明 V4(F/R)在扩增真核藻类类群中较有优势。

表 2　引物对扩增 SILVA 数据库中真核生物类群的特异性统计

Table 2　Specificity of the PCR primers foreukaryotarDNA sequences in the SILVA database

分类单元 Taxon	真核生物序列 eukaryotic sequence			分类单元 Taxon	真核生物序列 eukaryotic sequence		
	V9(F/R)	V4(F/R)	C4(F/R)		V9(F/R)	V4(F/R)	C4(F/R)
真菌 Fungi	0.11(816)	0.29(2165)	0.42(3122)	甲藻门 Dinophyceae	0.19(178)	0.61(583)	0.68(650)
后生动物 Metazoa	0.12(1524)	0.44(5628)	0.70(8900)	隐藻门 Cryptophyta	0.28(37)	0.91 (121)	0.88(117)
领鞭虫目 Choanoflagellida	0.36(16)	0.68(30)	0.89(39)	硅鞭藻纲 Dictyochophyceae	0.40(8)	0.95(19)	1.00(20)
植物界 Viridiplantae	0.17(691)	0.75(3137)	0.75(3115)	金藻纲 Chrysophyceae	0.29(42)	0.86 (123)	0.85(122)
定鞭藻纲 Haptophyceae	0.32(46)	0.80(114)	0.01 (2)	硅藻门 Bacillariophyta	0.23(150)	0.77 (514)	0.82(547)
绿藻门 Chlorophyta	0.27(344)	0.70(888)	0.67(850)	黄群藻纲 Synurophyceae	0.28(20)	0.72 (52)	0.72(52)

引物对主要扩增真核类群的频数分布,( )内的数字表示扩增该类群的序列数,( )前的数字表示扩增序列数占该类群序列数的比例

2.2　引物对基因组 DNA 扩增产物检测

为了比较 3 对引物在实际样品中对真核藻类扩增特异性的差异,对采集的 3 份样品分别进行了引物扩增。扩增产物的检测结果见图 1,本文中 3 对引物 V4(F/R)、V9(F/R)和 C4(F/R)的扩增产物片段分别为 370bp、135bp、380bp 左右,图 1 显示,片段长度检测结果与设计要求相符,扩增产物量满足测序需求,PCR 体系合格。

500bp　250bp　V4(F/R)　250bp　100bp　V9(F/R)　500bp　250bp　C4(F/R)

图 1　引物扩增片段检测

Fig.1　PCR amplification of representative DNA templates with rDNA primer sets

2.3　不同引物对的测序结果

通过 IlluminaHiSeq2500 测序平台 PE250 测序,得到的原始数据使用 FLASH 软件进行拼接,参照 Qiime 软件质量控制流程,将拼接后的序列经过截取、过滤得到有效数据。每个样品平均获得 68834 条原始序列,经过拼接和质量过滤,每个样品平均得到 68420 条有效序列,高质量数据占到 99%以上,获得基因注释的序列数在 97%以上,表明测得的数据准确可靠。9 个样品测序结果见表 3。

为了研究样品的物种组成多样性信息,使用 Uparse 软件对所有样品的有效序列进行聚类,以 97%的一致性将序列聚类成为 OTUs。每个样品平均获得 308 个 OTUs,每个 OTUs 代表一类物种。3 对引物 V4(F/R)、V9(F/R)和 C4(F/R)鉴定的平均微型/微微型浮游植物 OTUs 数分别为 78、42、58。

表 3 有效序列数及 OTUs 数

Table 3 The statistics of Effective Tags and OTUs numbers

引物名称 Primer	样品名称 Sample Name	原始序列 Raw Tags	有效序列 Effective Tags	注释序列 Taxon Tags	总 OUT Total OUT num	种水平平均 OTUs Average OUT num	种水平浮游植物 OTUs Phytoplankton OUT num
V4(F/R)	LDW1.1	61435	61213	57690	254	145	68
	LDW2.1	65094	64871	61954	272	148	73
	LDW3.1	57705	56319	55193	323	176	92
V9(F/R)	LDW1.2	63565	63547	59444	293	62	37
	LDW2.2	62681	62674	60858	461	74	46
	LDW3.2	77199	77177	75234	434	69	44
C4(F/R)	LDW1.3	64345	64117	63330	151	98	33
	LDW2.3	73653	73198	71258	250	139	59
	LDW3.3	93829	92663	90861	334	191	81

2.4 镜检优势种属与分子鉴定结果比较

镜检优势种属与高通量测序结果见表 4。从结果中可以看出引物 V4(F/R)对镜检优势种属的检出率与引物 C4(F/R)相当,并且都高于引物 V9(F/R),对于样品中物种多样性的挖掘,引物 V4(F/R)略高于引物 C4(F/R),且明显高于引物 V9(F/R)。

表 4 镜检优势种属与分子检测结果

Table 4 The microscopic examination results of three samples

样品编号 Sample	种类 Species names	镜检 Microscopic examination	藻类种类数 The numberofalgae species		
		密度 Density/(个/L)	V4(F/R)	V9(F/R)	C4(F/R)
1	*Thalassiosira* sp.	3.6	4	1	3
	Chaetoceros sp.	183.6	2	1	1
2	*Chaetoceros* sp.	606.7	1	4	1
	Noctilucascintillans	563.3	1	0	1
3	*Chaetoceros* sp.	102.5	2	0	2
	Asterionellopsisglacialis	315.0	1	0	1

根据表 5 注释结果,在种水平下,统计 3 对引物对应的测序鉴定结果,引物 V4(F/R)鉴定出的浮游植物数量多于 V9(F/R)和 C4(F/R)鉴定出的数量。3 对引物对优势种 *Dolichomastix tenuilepis*,细小微胞藻(*Micromonas pusilla*)、金牛微球藻(*Ostreococcus tauri*)、密球藻(*Pycnococcus provasolii*)、里氏金色藻(*Chrysochromu linaleadbeateri*)、抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)等微型和微微型浮游植物的鉴定能力比较,引物 V4(F/R)与 C4(F/R)相近,二者强于 V9(F/R)。

表 5 3 对引物鉴定浮游植物种类

Table 5 Amplification of Phytoplankton with three rDNA primer pairs

物种名称 Species names	拉丁文 Latin names	V4(F/R)	V9(F/R)	C4(F/R)
甲藻门 Phylum Dinoflagellata	*Akashiwo* sp.	+		
	Alexandrium pseudogoniaulax		+	
	Alexandrium tamarense		+	
	Amoebophrya sp.	+		+
	Amylax triacantha	+		+
	Ceratium tenue		+	
	Duboscquella sp.	+		+
	Gonyaulax polygramma	+	+	

续表

物种名称 Species names	拉丁文 Latin names	V4(F/R)	V9(F/R)	C4(F/R)
	Gyrodinium sp.	+	+	
	Karlodinium sp.	+		
	Karlodinium veneficum		+	
	Neoceratium sp.	+		
	Noctiluca scintillans	+	+	+
	Pelagodinium beii		+	
	Prorocentrum micans	+	+	+
	Prorocentrum minimum		+	
	Protoperidinium bipes	+		
	Protoperidinium pellucidum		+	
	Scrippsiella sp.	+		+
	Scrippsiella trochoidea		+	
	Stoeckeria sp.		+	
	Stoeckeria algicida	+		+
	Woloszynskia sp.	+		+
	Woloszynskia halophila		+	
绿藻门 Phylum Chlorophyta	*Bathycoccus* sp.	+		+
	Crustomastix sp.	+	+	+
	Dolichomastix tenui	+		+
	Mamiella gilva	+	+	+
	Mantoniella squamata		+	
	Micromonas pusilla	+	+	+
	Micromonas sp.		+	
	Nannochloris sp.	+	+	+
	Nephroselmis pyriformis	+	+	+
	Ostreococcus tauri	+	+	+
	Picochlorum sp.			
	Prasinophyceae sp. RCC39	+	+	+
	Pseudococcomyxa simplex		+	
	Pterosperma cristatum	+		+
	Pycnococcus provasolii	+	+	+
	Pyramimonas sp.	+		+
	Tetraselmis sp.	+		+
隐藻门 Phylum Cryptophyceae	*Geminigera cryophila*		+	
	Hemiselmis sp.	+		+
	Hemiselmis cryptochromatica	+	+	
	Katablepharid sp.	+		+
	Leucocryptos sp.	+		+
	Leucocryptos marina	+	+	+
	Myrionecta rubra		+	
	Rhodomonas sp.		+	
	Teleaulax gracilis	+		+
	Teleaulax sp.	+		+
	Teleaulax amphioxeia	+	+	+
定鞭藻门 Phylum Haptophyta	*Calyptrosphaera* sp. LKM-2007-1	+		+
	Chrysochromulina sp.	+		+
	Chrysochromu linaleadbeateri	+	+	

续表

物种名称 Species names	拉丁文 Latin names	V4(F/R)	V9(F/R)	C4(F/R)
	Emiliania sp.	+		+
	Haptolina fragaria	+		+
	Imantonia sp.	+		
	Prymnesiumn palpebrale		+	
	Tergestiella adriatica		+	
硅藻亚门	*Asterionellopsis glacialis*	+	+	+
Phylum Bacillariophytina	*Chaetoceros calcitrans*	+	+	+
	Chaetoceros muellerii	+	+	+
	Chaetoceros socialis		+	
	Chaetoceros sp. p442	+	+	+
	Cyclotella choctawhatcheeana		+	
	Ditylum brightwellii	+	+	+
	Entomoneis cf. alata	+		+
	Hyalosira sp.		+	
	Minutocellus sp.	+		+
	Peridiniumquin quecorne endosymbiont			+
	Pleurosigma planktonicum			+
	Rhizosolenia setigera		+	
	Rhizosolenia similoides		+	
	Skeletonema sp.	+		+
	Skeletonema pseudocostatum		+	
	Stephanopyxis turris	+		+
	Thalassiosira sp.	+		+
	Thalassiosira concaviuscul	+		+
	Thalassiosira mala		+	
	Thalassiosira minima	+		+
	Thalassiosira oceanica	+	+	+
不等鞭毛门	*Apedinella radians*	+	+	+
Phylum Heterokontophyta	*Aureococcus anophagefferens*	+	+	+
	Bolidomonas pacifica		+	
	Dictyocha fibula		+	
	Ochromonas sp.	+		+
	Dictyocha speculum	+	+	+
	Florenciella parvula	+	+	+
	Heterosigma akashiwo	+	+	+
	Paraphysomonas sp.	+		+
	Pedinella sp. squamata		+	
	Phaeocystis antarctica		+	
	Pseudochattonell afarcimen	+		+
	Pseudopedin ellaelastica	+	+	+
	Pteridomonas sp.	+		+
	合计	64	57	57

+表示引物扩增片段的注释结果在3个样品中任意出现一次即标记+

3 讨论

分子生物学技术极大地推动了微型真核藻类多样性的研究。目前,世界各大海域的微微型浮游生物分子

多样性逐步开展研究,相关基因文库数据也在不断更新和扩充[19-22]。针对海洋微型和微微型藻类鉴定方面存在的难题,本实验选择 18S rDNA 的可变区作为目标基因,构建高通量测序文库,应用生物信息学处理数据,对海洋微型和微微型藻类进行了多样性研究。18S rDNA 结构和功能保守,区分力可达种属水平,常用于真核生物物种鉴定和系统发生学分析。18SrDNA 全长序列交替排列着保守区和可变区,反映了生物种间的亲缘关系和物种间的差异,利用了保守区设计引物,扩增出可变区,根据不同种属可变区的序列特征进行分类[23]。真核生物共含有 8 个可变区,其中 V4 和 V9 区是目前广泛使用的真核生物标记基因[24]。Wuyts 等比较分析了 3253 条核糖体 rDNA 核酸序列的 V4 区,发现该区域为真核生物核糖体 rDNA 种多样性最大的区域[25]。Stoeck 和 Micah 等人研究发现,V4 区在区分亲缘关系较近的物种具有较大优势[16],且与 V9 区相比,V4 区得到的实验结果更接近于以 18S rDNA 全长为目标基因的研究结果[23,26]。18S rDNA 的 V4 区变异较大、长度较长、均一性好,适用于高通量测序技术,是微微型藻类鉴定的良好目标基因。

本文通过对 3 对引物的敏感性、特异性进行评估结果显示:引物 V4(F/R)对真菌、后生动物、领鞭毛虫目类群的扩增特异性要低于 V9(F/R)和 C4(F/R),而对真核藻类的扩增特异性均高于 V9(F/R),扩增红藻门的特异性低于 C4(F/R)。为了验证引物 V4(F/R)、V9(F/R)和 C4(F/R)对海水样品中微型/微微型浮游植物多样性分析的可行性和差异性,采用 IlluminaHiSeq2500 测序平台 PE250 测序,解析出在种的水平下每对引物对应的平均微型/微微型浮游植物 OTUs 数,并与样品的显微镜检测结果进行比较。结果显示,引物对 V4(F/R)在微型/微微型浮游植物种类数鉴定方面优于其他两对引物。高通量测序获得浮游植物种类与显微镜观察结果进行比较,引物 V4(F/R)对镜检结果中的藻类的检出率与引物 C4(F/R)相同,并且都高于引物 V9(F/R),对于样品中物种多样性的挖掘能力,引物 V4(F/R)略高于引物 C4(F/R),且明显高于引物 V9(F/R)。

根据注释结果,在种水平下,统计 3 对引物对应的扩增产物的鉴定结果,3 对引物对优势种细小微胞藻、金牛微球藻、密球藻、里氏金色藻、抑食金球藻、赤潮异弯藻等微型和微微型浮游植物的鉴定能力,引物 V4(F/R)与 C4(F/R)相近,二者高于 V9(F/R)。其中,金牛微球藻是一种单细胞绿藻,直径 0.8μm 左右,是目前发现的个体最小、细胞结构简单、基因组结构却十分复杂的自养真核细胞生物[27]。Vaquer 等[2]发现了法国肖泻湖(Thaulagoon)金牛微球藻丰度与铜含量有关,并发现贝类无法摄食这种藻类。赤潮异弯藻是一种细胞微小、分布广泛、广温、广盐性赤潮藻种,对其他生物影响较大[29-31]。抑食金球藻,呈金光色球形或亚球形,直径 2μm 左右,属于微微型藻类,是目前发现引发褐潮的主要种类,对生态环境和渔业养殖影响较大[32]。2013 年 7 月在长兴岛近岸海域出现水色异常现象,经分子检测,主要优势种为抑食金球藻,丰度超过 10^7 个/L[33]。于杰等人利用通用引物扩增 18S rDNA 可变区 V9 后,结合高通量技术,建立浮游生物多样性高效检测技术,对渤海海域的 4 个褐潮多发区的优势藻种进行分析,发现抑食金球藻和多形微眼藻共同引发了该海域的褐潮[34]。

本研究表明,以 18S rDNA 的 V4 区作为目标基因,设计引物 V4(F/R),借助 IlluminaHiSeq 2500 PE250 高通量测序平台和生物信息学方法,建立了海洋微型和微微型藻类高效检测方法。该方法既传承了传统分子技术的特点,又具有一些独特的优势:测序通量高,实验流程简单;数据处理快速、准确;灵敏度高;节约成本;适用性广泛。针对海洋中不同水域、水层、时间的微型/微微型浮游植物多样性的研究均适用。

参考文献(References):

[1] 高亚辉. 厦门港微型浮游硅藻研究[D]. 厦门: 厦门大学, 1990.

[2] Lee S R, Oak J H, Chung I K, Jin A L. Effective molecular examination of eukaryotic plankton species diversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP, and sequencing. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(6): 699-707.

[3] Balzano S, Marie D, Gourvil P, Vaulot D. Composition of the summer photosynthetic pico and nanoplankton communities in the Beaufort Sea assessed by T-RFLP and sequences of the 18S rRNA gene from flow cytometry sorted samples. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1480-1498.

[4] Wu L, Yu Y, Zhang T L, Feng W S, Zhang X, Li W. PCR-DGGE Fingerprinting Analysis of Plankton Communities and Its Relationship to Lake Trophic Status. International Review of Hydrobiology, 2009, 94(5): 528-541.

[5] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, Clardy J, Goodman R M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry &Biology, 1998, 5(10): R245-R249.

[6] Massana R, Karniol B, Pommier T, Bodaker I, Béjà O. Metagenomic retrieval of a ribosomal DNA repeat array from an uncultured marine alveolate. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1335-1343.

[7] Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 77(4): 1153-1161.

[8] 陈随清, 王利丽. rRNA 基因(rDNA)序列分析在中药品种鉴定中的应用及研究进展. 河南中医药学报, 2003, 8(2): 86-88.

[9] Neefs J M, Van de Peer Y, Hendriks L, De WachterR. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Research, 1990, 18 (Suppl): 2237-2317.

[10] Van Der Staay S YM, De Wachter R, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature, 2001, 409(6820): 607-610.

[11] López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, Moreira D. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. Nature, 2001, 409(6820): 603-607.

[12] 邵鹏, 袁洁, 陈月琴, 屈良鹄, 黄邦钦. 自然水样微型藻类遗传多样性的方法学研究. 海洋科学,2002, 26(4): 1-4.

[13] 袁洁, 邵鹏, 陈月琴, 蔡创华, 屈良鹄. 南沙群岛微型与超微型真核藻类遗传多样性的初步研究. 海洋科学, 2003, 27(7): 43-47.

[14] Yuan J, Chen M Y, Shao P, Zhou H, Chen Y Q, Qu L H. Genetic diversity of small eukaryotes from the coastal waters of Nansha Islands in China. FEMS Microbiology Letters, 2004, 240(2): 163-170.

[15] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, Welch D M, Huse S M, Neal P R, Arrieta J M, Herndl G J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciencesof the United States of America, 2006, 103(32): 12115-12120.

[16] Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones M D, Breiner H W, Richards T A. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. Molecular Ecology, 2010, 19(S1): 21-31.

[17] Behnke A, Engel M, Christen R, Nebel M, Klein RR, Stoeck T. Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions. Environmental Microbiology, 2011, 13(2): 340-349.

[18] Amaral-Zettler LA, McCliment E A, Ducklow H W, Huse S M. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. PLoS One, 2009, 4(7): e6372.

[19] Worden A Z. Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 43(2): 165-175.

[20] Marie D, Zhu F, Balagué V, Ras J, Vaulot D. Eukaryotic picoplankton communities of the mediterranean sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55(3): 403-415.

[21] 李绿砚. 中国南海微型与超微型真核浮游生物的分子生态学研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.

[22] 江雪娇. 北黄海微微型浮游植物的丰度及微微型真核浮游生物分子多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.

[23] Pawlowski J, Christen R, Lecroq B, Bachar D, Shahbazkia HR, Amaral-Zettler L, Guillou L. Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. PLoS One, 2011, 6(4): e18169.

[24] KI J S. Hypervariable regions (V1-V9) of the dinoflagellate 18S rRNA using alarge dataset for marker considerations. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(5): 1035-1043.

[25] Wuyts J, De Rijk P, Van de Peer Y, Pison G, Rousseeuw P, De Wachter R. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 2000, 28(23): 4698-4708.

[26] Dunthorn M, Klier J, Bunge J, Stoeck T. Comparing the Hyper-Variable V4 and V9 regions of the small subunit rDNA for assessment of ciliate environmental diversity. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2012, 59(2): 185-187.

[27] Courties C, Perasso R, Chrétiennot-Dinet M J, Gouy M, Guillou L, Troussellier M. Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). Journal of Phycology, 1998, 34(5): 844-849.

[28] VaquerA, TroussellierM, CourtiesC, BibentB. Standing stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau Lagoon (northwest Mediterranean coast). Limnology and Oceanography, 1996, 41(8): 1821-1828.

[29] 颜天, 周名江, 钱培元. 赤潮异弯藻 *Heterosigma akashiwo* 的生长特性. 海洋与湖沼, 2002, 33(2):209-214.

[30] Bowers H A, Tomas C, Tengs T, Kempton J W, Lewitus A J, Oldach D W. Raphidophyceae [Chadefaud Ex Silva\] systematics and rapid identification: sequence analyses and Real-Time PCR Assays. Journal of Phycology, 2006, 42(6): 1333-1348.

[31] Keppler C J, Hoguet J, Smith K, Ringwood A H, Lewitus A J. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). Harmful Algae, 2005, 4(2): 275-285..

[32] Probyn T, Pitcher G, Pienaar R, Nuzzi R. Brown tides and mariculture in Saldanha Bay, South Africa. Marine Pollution Bulletin, 2001, 42(5): 405-408.

[33] 辽宁省海洋与渔业厅. 2013 年辽宁省海洋环境状况公报. 中国海洋报, 2014-04-09.

[34] 于杰. 浮游生物多样性高效检测技术的建立及其在渤海褐潮研究中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.